

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

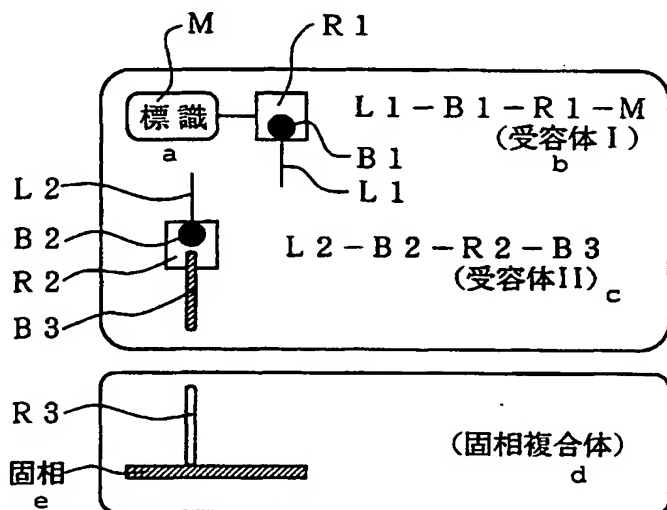
(10) 国際公開番号
WO 01/20328 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06187 (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 奥 裕一 (OKU, Yuichi) [JP/JP]. 神谷尚徳 (KAMIYA, Hisanori) [JP/JP]. 篠原久美子 (SHINOHARA, Kumiko) [JP/JP]. 柴原裕亮 (SIBAHARA, Yusuke) [JP/JP]. 上坂良彦 (UESAKA, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究本部内 Ibaraki (JP).
(22) 国際出願日: 2000年9月11日 (11.09.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願平11/258771 1999年9月13日 (13.09.1999) JP (74) 代理人: 光来出良彦 (MITSUKUDE, Yoshihiko); 〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町2-1 T金井ビル Tokyo (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日水製薬株式会社 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒170-0002 東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号 Tokyo (JP). (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: KIT FOR DETECTING OR ASSAYING SUBJECT SUBSTANCE AND DETECTION OR ASSAY METHOD

(54) 発明の名称: 被測定物質の検出又は測定用キット、及び検出又は測定方法



- a...MARKER
b...RECEPTOR I
c...RECEPTOR II
d...SOLID PHASE COMPLEX
e...SOLID PHASE

binding element B3 to a solid phase.

(57) Abstract: A kit which can be produced at a high yield and by which a ligand can be easily labeled and the sensitivity of a reagent can be controlled; and a process for producing the same. The kit aims at detecting and assaying a subject substance A having a divalent or higher binding property to a ligand L1 and contains a receptor I, a receptor II and a solid phase complex each as will be specified below. Receptor I: L1-B1-R1-M obtained by bonding R1-M, which is obtained by bonding a marker M to a substance R1 capable of binding to a substance B1, to L1-B1 which is obtained by bonding a ligand L1 to the substance B1. Receptor II: L2-B2-R2-B3 obtained by preliminarily bonding L2-B2, which is obtained by introducing a substance B2 having a binding property different from the subject substance A, into a ligand L2, to R2-B3 which is obtained by bonding a binding element B3 having a different binding property from B2 to a substance R2 capable of binding to the substance B2. Solid complex: R3-solid phase obtained by bonding a non-binding element R3 capable of binding to the

[続葉有]

WO 01/20328 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

キットを製造する際の収率が高く、容易にリガンドを標識することができ、試薬の感度をコントロールすることができるキット、及びその製造方法を提供する。リガンドL 1に対して2価以上の結合性を有する被測定物質Aの検出・測定キットであり、以下の受容体I、受容体II、固相複合体を包含する。受容体I：物質B 1に結合性を有する物質R 1にマーカ－Mを結合させてなるR 1－Mと、リガンドL 1と物質B 1からなるL 1－B 1を結合させたL 1－B 1－R 1－M。受容体II：被測定物質Aとは異なる結合性を有する物質B 2をリガンドL 2に導入したL 2－B 2と、物質B 2に対して結合性を有する物質R 2にB 2とは異なる結合性の結合子B 3を結合させてなるR 2－B 3を予め結合させて得られたL 2－B 2－R 2－B 3。固相複合体：結合子B 3に対して結合性を有する被結合子R 3を固相に結合させてなるR 3－固相。

明 細 書

被測定物質の検出又は測定用キット、及び検出又は測定方法

技術分野

- 5 本発明は、液体試料中に包含される２価以上の結合性を有する被測定物質を検出あるいは測定するキットであって、被測定物質に特異的に結合するリガンドに対して直接結合してマーカーにて標識するか、あるいは間接的に結合してマーカーにて標識してなるリガンド・マーカー複合体と、被測定物質に特異的に結合するリガンドを
- 10 固相に結合するための結合子とを含むリガンド・結合子複合体と、該リガンド・結合子複合体を、固相に捕獲するための被結合子を結合させた固相とを含むことからなるキット、及び検出又は測定方法に関する。

15 背景技術

- 液体試料中に包含される抗体などリガンドに対する２価以上の結合性を有する物質を検出あるいは測定する方法には、次の方法が知られている。すなわち、リガンドを酵素などのマーカーで標識したものと、固相にリガンドを結合させたものを準備しておき、前記リ
- 20 ガンドをマーカーで標識したものと、液体試料中の抗体とを反応させる。次いでこの溶液を前記リガンド結合固相と反応させて、固相に結合したマーカーの有無を検出あるいは量を測定する方法である（例えば、特開平９－２２９９３８号公報）。この方法では、同じリガンドに対する抗体が標識リガンドに予め反応してしまうために
- 25 、固相化されたリガンドに反応しなくなり、感度が低い場合が多かった。

そのため、特許第２５３２７８８号公報にあるように、捕獲種（

R) を固相に結合させておき、第一の免疫学的物質 (I 1) と検出可能な同位体 (M) との結合生成物からなる分散された第一の粒子の第一のバッチ (M-I 1) と、第 2 の免疫反応性物質 (I 2) と捕獲可能種 (B) との第 2 の結合生成物からなる分散された第 2 の粒子の第 2 のバッチ (I 2-B) とを、免疫反応性分析物 (G) を介して結合させて複合体 (M-I 1-G-I 2-B) を形成させ、固相に結合させた捕獲種 (R) と反応させて、免疫反応性分析物の介在あるいは量を評価する方法があった。この方法では、第一の免疫学的物質 (I 1) と第二の免疫学的物質 (I 2) を同一のものを
5 用いることにより、第一の免疫学的物質 (I 1) と検出可能な同位体 (M) 同志で免疫反応性分析物 (G) が結合せずに、第一の免疫学的物質 (I 1) と第 2 の免疫反応性物質 (I 2) が、同時に免疫反応性分析物 (G) と反応するために感度が高いという特色がある。

さらに、特開平 10-253632 号公報には、オリゴヌクレオチド (ON) を固相化しておき、そのオリゴヌクレオチド (ON) と相補的なオリゴヌクレオチド (ON') で標識されたりガンド (ON'-L) (例えば、ON'-抗原又は ON'-抗体) と、マーカー標識化リガンド (M-L) とを、リガンド (L) 対して結合する分析物 (A) に対して反応させ、複合体 (ON'-L-A-L-M) を形成させて、オリゴヌクレオチド結合固相と該複合体中に含まれるオリゴヌクレオチド同志の相補的な結合により、固相に複合体を結合させることによりマーカー (M) の有無、量により分析物を評価する方法が示されている。この方法では、分析物 (A) とマ
20 ーカー標識化リガンド (M-L) が先に複合体を形成せずに、ON'-L と M-L が同時に分析物 (A) と反応するために、特許第 2532788 号公報の方法と同様に感度が高いという特性を有する

。さらにこの方法では、固相化するオリゴヌクレオチド、対応するリガンド（L）に結合させるオリゴヌクレオチドをそれぞれ配列を変化させることにより複数の分析対象物を同時に測定することが可能になる。

- 5 前記特許第 2 5 3 2 7 8 8 号公報あるいは特開平 1 0 - 2 5 3 6 3 2 号公報の方法のように感度高く、測定対象物を検出あるいは測定するには、第一あるいは第二の免疫反応性物質、あるいは配位子を何らかの結合子で標識する必要がある。

10 しかしながら、前記免疫反応性物質あるいはリガンド（L）を直接結合子で標識する場合、標識化工程の途中における標識化リガンド（L）の精製過程で、リガンド（L）の物性が変化して不溶化しやすく、結合子標識化配位子（例えば、結合子で標識された抗原）の回収率が著しく低下する場合があった。

15 一方、低分子のペプチドをリガンド（L）として直接標識する際に標識されたペプチドは回収されるものの、立体配置による障害と思われる免疫化学的反応性の低下が起きることもあった。さらに、低分子のペプチドを金属コロイド、着色ラテックスなどで標識しようとした場合、低分子であるが故に、標識ができないといったこともあった。

20 特許第 2 5 0 1 9 6 0 号公報には、マーカーで標識化された特異的結合能を有する物質 P 2（例えば、アビジン、ストレプトアビジン）と、マーカーで標識化されていない特異的結合能を有する物質 P 2 と、P 2 に対する 1 価の結合成分 P 1（例えば、ビオチン）とリガンド R 1 を結合させた化合物 P 1 - R 1、及び、前記マーカー
25 で標識されていない物質 P 2 が固相に結合されたものからなる試薬が示されている。該試薬は、複合体あたりのリガンド量を調整することができないため、あるいは、固相との反応がビオチン-アビジ

ンによる結合性であり、強固な結合性であるため、試薬の感度をコントロールすることが困難という問題がある。そのため、他の要因による極微量な免疫物質に対しても反応してしまい、好ましくない判定結果をもたらす場合もある。

- 5 そこで、本発明の目的は、抗体などのリガンドに対して2価以上の結合性を有する、液体試料中に包含される分析対象物質を検出あるいは測定するキットであって、簡易に検出あるいは測定でき、キットを製造する際の収率が高く、低分子量のリガンドや、高分子量のリガンドであっても、さらにはタンパク質の一部を構成するリガ
10 ンドであって、容易に標識することができ、例えば、リガンドにマーカを標識させる場合にリガンドが低分子化合物であっても、収率よくリガンド・マーカ複合体を製造することができ、キット中に含まれるリガンドの量の調整を可能とすることにより、あるいは、固相と複合体との結合性を変化させることができ、その結合性を
15 変化させることにより試薬の感度をコントロールすることができるキットを提供すること、被測定物質の検出又は測定方法を提供することである。

発明の開示

- 20 本発明は、上記課題を解決するために下記のようなキットを構成することからなる。

- 本発明の1番目の型式のキットは、2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定
25 物質からなる複合体を捕獲するための下記の下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

 1) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカMを結

合させてなる化合物 $R_1 - M$ と、被測定物質 A と結合性を有するリガンド L_1 と物質 B_1 を結合させてなる化合物 $L_1 - B_1$ を結合させてなる化合物 $L_1 - B_1 - R_1 - M$ で表される受容体 I ;

2) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L_2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B_2 を導入してなる化合物 $L_2 - B_2$ と、物質 B_2 に対して結合性を有する物質 R_2 に該物質 B_2 とは異なる結合性を有する結合子 B_3 を結合させてなる化合物 $R_2 - B_3$ を予め結合させて得られた化合物 $L_2 - B_2 - R_2 - B_3$ で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 B_3 に対して結合性を有する被結合子 R_3 を固相に結合させてなる化合物 $R_3 - \text{固相}$ で表される固相複合体。

本発明の 2 番目の型式のキットは、タンパク質 P の一部を構成するリガンド L_3 に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I 、下記の受容体 II 、並びに受容体 I 、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

1) タンパク質 P にマーカー M を結合させた化合物 $P - M$ で表される受容体 I ;

2) タンパク質 P あるいはリガンド L_3 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B_2 を導入してなる化合物 $P - B_2$ あるいは $L_3 - B_2$ と、物質 B_2 に対して結合性を有する物質 R_2 に該物質 B_2 とは異なる結合性を有する結合子 B_3 を結合させてなる化合物 $R_2 - B_3$ を結合させて得られた化合物 $P - B_2 - R_2 - B_3$ あるいは $L_3 - B_2 - R_2 - B_3$ で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 B_3 に対して結合性を有する被結合子 R_3 を固相に結合させてなる化合物 $R_3 - \text{固相}$ で表される固相複合体。

本発明のキットにおいて、固相複合体は、少なくとも受容体IIとは独立して存在している。即ち、測定前では固相複合体は、受容体II及び受容体Iと独立した組み合わせのキットであるか、あるいは、受容体IIと独立し、受容体Iと同じ系の組み合わせのキットであってもよい。

本発明の3番目の型式のキットは、2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

1) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカ－Mを結合させてなる化合物R1-Mと、被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1を結合させてなる化合物L1-B1を結合させてなる化合物L1-B1-R1-Mで表される受容体I；

2) 被測定物質Aと結合性を有するリガンドL2に被測定物質Aとは異なる結合性を有する結合子B3を予め結合させて得られた化合物L2-B3で表される受容体II；及び、

3) 結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される固相複合体。

本発明のキットにおいて、2価以上の結合性を有する被測定物質Aは、DNA、RNA、抗原及び抗体の群から選ぶことができる。

本発明のキットにおいて、リガンドL1とリガンドL2が同一物質（例えば、アビジン同士、又はストレプトアビジン同士）であっても、異なる配列を持つ物質（例えば、配列の異なるDNA同士又はRNA同士の組み合わせ、あるいはアビジンとストレプトアビジンの組み合わせ）であってもよい。

本発明のキットにおいて、リガンドL（L1、L2、L3）は、

DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ぶことができる。

5 本発明のキットにおいて、物質R 1及び／又は物質R 2は、ストレプトアビジン、アビジン、抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ぶことができる。

本発明のキットにおいて、物質R 1と物質R 2が同一物質（例えば、アビジン同士、又はストレプトアビジン同士）であっても、異なる物質（例えば、アビジンとストレプトアビジン）であってもよい。

10 本発明のキットにおける、物質B 1及び／又は物質B 2は、ビオチン、DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質が使用できる。本発明のキットにおいて、代表的な例には、物質B 1及び／又は物質B 2にビオチンが使用される場合である。このような場合には、物質R 1と物質R 2にアビジン同士、及び／又はストレプトアビジン同士が使用される。

15 本発明のキットにおける、物質B 1と物質R 1、あるいは物質B 2と物質R 2の結合性は、解離定数として 10^{-8} から 10^{-16} （M）の範囲が好ましい。

20 本発明のキットにおいて、マーカーには、例えば、着色色素、蛍光色素、発光性物質、金属コロイド、ラテックス、リポソーム、放射性同位元素、酵素、DNA及びRNAなる群から選ばれた物質を使用することができる。

25 本発明で使用される固相には、ポリスチレン、ニトロセルロース、ナイロン、セルロース及びガラスの群から選ばれた物質が好適に使用される。

本発明の被測定物質Aを検出又は測定するための1番目の型式のキット使用する検出又は測定方法は、2価以上の結合性を有する被

測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカー M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 L 2 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを特徴とする方法である。

本発明の被測定物質 A を検出又は測定するための 2 番目の型式のキットを使用する検出又は測定方法は、タンパク質 P の一部を構成するリガンド L 3 に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) タンパク質 P にマーカー M を結合させた化合物 P - M で表される受容体 I、並びに

3) タンパク質 P あるいはリガンド L 3 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 P - B 2 あるいは

L 3 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を結合させて得られた化合物 P - B 2 - R 2 - B 3 あるいは L 3 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを特徴とする方法である。

本発明の被測定物質 A を検出又は測定するための 3 番目の型式のキット使用する検出又は測定方法は、2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカー M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを

特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法である。

上記の被測定物質 A を検出又は測定する 3 つの方法において、前記各 1) ~ 3) の要件による複合体を形成する方法は、1 工程で同時に反応を進行させて実施してもよいし、複数工程で接触させる順序を変えて順次実施してもよい。

本発明の 1 番目の型式のキットに使用される化合物 $L1-B1-R1-M$ (受容体 I) の実施の態様において、物質 $R1$ としてストレプトアビジン又はアビジンを使用し、マーカー M として金属コロイド又は酵素を結合させた物質を使用し、化合物 $L1-B1$ としての
10 のビオチン結合リガンドなる物質を、ビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの特異的結合反応により結合させてなる化合物は、新規物質として特徴がある。

本発明の 1 番目の型式のキットは、リガンド $L1$ が水溶性の場合にも適用できるが、特に、不溶性が高い場合に好適である。不溶性
15 の高いリガンド $L1$ は、直接標識すると不溶性の性質が複合体に付与されてしまい、非特異反応の原因となる場合がある。しかしながら、例えば、親水性が比較的高いアビジンあるいはストレプトアビジンなどの物質 $R1$ 又は $R2$ と結合することにより、複合体となった化合物 $L1-B1-R1-M$ (受容体 I) あるいは化合物 $L2-B2-R2-B3$ (受容体 II) を全体として親水性にすることが可能
20 となり、非特異反応の発生を防止できる。

なお、リガンド $L1$ がどのような物質であっても、キットを構成する各複合体を調製するのに、ビオチン-アビジン反応を用いた場合には、複合体調製時の条件が一定にできる。このことにより、省力化が可能となる。本発明では予め複合体としての $L2-B2-R2-B3$ (受容体 II) を調製している。そのため、複合体当たりリ
25 ガンド量をコントロールできる。このことにより、試薬の感度をコ

ントロールすることができる。

本発明の 2 番目の型式のキットは、リガンド L 2 が低分子ではなく、水溶性の高分子、例えば、水溶性タンパク質である場合に好適である。このようなタンパク質をリガンド L 2 とする場合には、リ
5 リガンド L 2 はマーカー M で直接標識可能である。

本発明の 3 番目の型式のキットは、被測定物質 A が、DNA 又は RNA のオリゴヌクレオチドの測定に好適であり、この場合、リガ
10 ンド L 1 は被測定物質 A のオリゴヌクレオチドの一方の端部の配列に対して少なくとも相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドであり、リガンド L 2 は被測定物質 A のもう一方の端部の配列に対して
少なくとも相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。さらに、この場合、リガンド L 2 の被測定物質 A の結合側とは反対の端部の配列は、固相に結合された DNA 又は RNA のオリゴヌクレオ
チドの配列に対して少なくとも相補的である。

15

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の 1 番目の型式のキットの構成成分の実施の態様を
図示したものである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体
に保存されることを示す。

20 図 2 は、本発明の 1 番目の型式のキットを用いて被測定物質 A を
固相に捕獲した状態を示す。

図 3 は、本発明の 1 番目の型式のキットのうちの試薬成分を製造
するためのフロー図であり、詳しくは、化合物 L 1 - B 1 - R 1 -
M で表される受容体 I と、化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表され
25 る受容体 II の調製フロー図である。

図 4 は、本発明の 2 番目の型式のキットの構成成分の実施の態様
を図示したものである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体

に保存されることを示す。

図 5 は、本発明の 2 番目の型式のキットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。

図 6 は、本発明の 3 番目の型式のキットの構成成分の実施の態様
5 を図示したものである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体に保存されることを示す。

図 7 は、本発明の 3 番目の型式のキットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。

図 8 は、リガンド L 1 とリガンド L 2 が異なる配列を持つ物質で
10 ある場合の本発明のキットを用い、被測定物質 A と反応させ、受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を固相複合体に捕獲した状態を示す。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明の技術的意義を次に発明の実施の態様に基づいて説明する。

アビジン又はストレプトアビジンと、ビオチンの結合は 10^{-15} (M) という結合定数を示し一般的な免疫反応の結合定数の 100 倍以上の良好な結合性を示す。この結合は 6 - 8 M グアニジン、pH 1.5、120℃ の条件下 15 分間で解離することが報告されており (Green, N.: Purification of Avidin, in Methods in Enzymology, XVIII, (McCormick, D., and Wright, L., eds.), Academic Press, NY, 414 (1970).)、常温では極めて安定な結合体が形成される。

25 R 1 又は R 2 としてアビジン又はストレプトアビジンを用いた、本発明の 1 番目の型式のキットの具体例について説明する。R 1 又は R 2 としてのアビジン又はストレプトアビジンと、B 1 又は B 2

としてのビオチン等の強固な結合を利用してリガンドL1とマーカーMを結合させてなる化合物L1-B1-R1-Mで表される受容体I、あるいはリガンドL2と結合子B3としてのオリゴヌクレオチドを結合させてなる化合物L2-B2-R2-B3で表される受容体IIが使用できる。

前記受容体Iの調製は、あらかじめリガンドL1に物質B1としてのビオチンを導入したもの（化合物L1-B1）と、物質R1としてのアビジン又はストレプトアビジンにマーカーMを結合させたもの（化合物R1-M）を調製しておき、これらの化合物におけるアビジン又はストレプトアビジンR1とビオチンB1との結合により、化合物L1-B1-R1-Mなる複合体（受容体I）を極めて容易に、安定に調製することが可能となる。このようにして得られた複合体は、実質的にリガンドL1をマーカーMで標識したものである。

この方法により調製した複合体である化合物L1-B1-R1-M（受容体I）は、マーカーMが、例えば、アビジン又はストレプトアビジン（R1）に結合し、さらに、例えば、アビジン又はストレプトアビジン（R1）にビオチン化リガンド（化合物L1-B1）が結合したものである。したがって、リガンドL1が低分子量のペプチドなどの立体障害的な影響を受けやすい物質であっても、マーカーMは高分子であるアビジン又はストレプトアビジン（R1）を介在して結合しているので、こうした影響を受けにくい。また、リガンドL1がマーカーMに直接結合できないような物質であっても、この方法によれば、確実にリガンドL1とマーカーMの複合体が調製できる。

なお、リガンドL3が立体障害が生じないような比較的安定な物質である場合、即ち、タンパク質Pの一部を構成するリガンドL3

には、マーカーMはリガンドL₃ 或いはリガンドL₃を含むタンパク質Pに直接結合させて化合物P-Mをリガンド-マーカー複合体（受容体I）として用いることができる（本発明の2番目の型式のキット）。

- 5 物質B₁と物質B₂が同一で、リガンドL₁とL₂が同一の場合には、次の方法で、本発明の1番目の型式のキットの調製が容易となる。本発明における受容体II、即ち、リガンドL₂と結合子B₃とを複合させた化合物（L₂-B₂-R₂-B₃）を調製するには、結合子B₃として、例えば、オリゴヌクレオチドONを用いる場合
- 10 合には、予め、物質R₂とオリゴヌクレオチドON（結合子B₃）を結合させたもの（化合物R₂-ON）を準備しておき、受容体I（L₁-B₁-R₁-M）を調製したときに準備した化合物L₁-B₁（ただし、L₁-B₁はL₂-B₂と同一化合物である）を前記化合物R₂-ONと反応させて、化合物L₂-B₂-R₂-ON
- 15 なる複合体（受容体II）を調製する。この方法によって、リガンドL₂とヌクレオチドON（結合子B₃）を含む複合体を調製することが可能となる。

この方法によれば、リガンドL₂が低分子量のペプチドなどの標識が難しい物質であっても、物質R₂（例えば、ストレプトアビジン、アビジン、抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質）と、物質B₂の介在により、確

20 実にリガンドL₂とヌクレオチドON（結合子B₃）との複合体が調製できる。

本発明の1番目の型式のキットを構成するには、図3のフロー図

25 に示すように、化合物R₁-Mと化合物R₂-B₃（例えば、R₂-ON）を予め準備しておき、且つ、化合物L₁-B₁（但し、化合物L₁-B₁と化合物L₂-B₂とは同一化合物の場合）を共通

に使用して、リガンドL 1 とマーカーMの複合体、即ち、L 1 - B 1 - R 1 - Mで表される受容体I、及びリガンドL 2 と結合子B 3（例えば、オリゴヌクレオチドON）の複合体、即ち、化合物L 2 - B 2 - R 2 - B 3で表される受容体IIの調製することにより、本
5 発明の1番目の型式のキットを極めて容易に調製することができる。

さらに、物質R 1 又は物質R 2 として用いられるアビジン又はストレプトアビジンは物質B 1 又は物質B 2 としてのビオチンとの結合部位を1分子あたり4個保有しているため、リガンドL 1 又はリ
10 ガンドL 2 の導入比を、アビジン又はストレプトアビジン当たり1から4個の間で変化させることが可能で、この導入率を制御することにより反応性、感度をコントロールすることも可能となる。

リガンドL 1 又はリガンドL 2 が疎水性の強い物質である場合、リガンドL 1 にマーカーMを、あるいはリガンドL 2 にオリゴヌクレオチドONなどの結合子B 3 を直接導入すると、さらに物性が変
15 化し、疎水性がさらに強まり非特異的な結合の原因になる場合も少なくない。しかしながら、本発明の1番目の型式のキットのように、リガンドービオチンと、アビジンーマーカーあるいはアビジンー結合子とを結合させる場合には、リガンドとマーカーの複合体ある
20 いはリガンドと結合子の複合体を調製する際には、アビジンが親水性に富んでいるためリガンドの疎水性をアビジンと結合することによって軽減でき、疎水性に由来する非特異的な反応を除去することも可能である。また、上述したようにアビジンとリガンドービオチンの導入比を変化させることにより、こちらの方からも反応性を制
25 御することが可能である。

以上の説明は主として本発明の1番目の型式のキットについてのものであるが、本発明の2番目の型式のキットについては1番目の

型式のキットと同様なことが言える。

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相に複合体を捕獲するために、結合子 B 3 と被結合子 R 3 を結合させたものを用いており、これらの結合を種々の結合性の異なる組み合わせの物質を採用することにより、結合性の強弱を
5 変化させることができ、即ち、試薬の感度をコントロールすることができる。例えば、レクチン-糖の結合反応では、ビオチン-アビジン結合反応よりもはるかに反応性が低いため、B 3 と R 3 にレクチン-糖を用いれば、ビオチン-アビジン反応を用いたものよりも、より多くの抗原あるいは抗体が無ければ反応しないキットを構成
10 することが可能となる。

結合子 B 3 と被結合子 R 3 を少なくとも一部が相補的な配列をもつ RNA、DNA のオリゴヌクレオチドを使用して結合する場合には、オリゴヌクレオチドの相補的配列の長短を変化させることにより、結合性の強弱をコントロールすることができ、試薬の感度を
15 コントロールすることができる。

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相化するオリゴヌクレオチド、対応する配位子に結合させるオリゴヌクレオチドの組み合わせを複数個用意し、それぞれの組み合わせに対応させた複数の分析対象物に特異的に結合するリ
20 ガンドを選択してキットを構成することにより、複数の分析対象物を同時に検出又は測定することが可能になる。

図 8 は、リガンド L 1 とリガンド L 2 が異なる配列を持つ物質である場合の本発明のキットを用い、被測定物質 A と反応させ、受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を固相複合体に捕獲
25 した状態を示す。具体的には、図 8 で示す被測定物質 A は、RNA 又は DNA のオリゴヌクレオチドである。該オリゴヌクレオチドの

両端の配列に対して相補的な配列を有する、一方のオリゴヌクレオチドをリガンドL1とし、他方のオリゴヌクレオチドをリガンドL2としている。図8の態様を構成するキットの構成要素は、前記本発明の1番目の型式のキットと同じである。

5 実施例1

オリゴヌクレオチドの合成

5 末端にアミノ基を有する以下のようなオリゴヌクレオチドをパーキンエルマー社製DNA合成装置391Aを用いて、それぞれ合成した。一部のものは、サワディーテクノロジー社に合成を依頼した。

10 アミノ基-GAA TTC CCG GGG ATC CGT C
G (以下「ペア1+」という)

アミノ基-CGA CGG ATC CCC GGG AAT T
C (以下「ペア1-」という)

15 アミノ基-AAC GGA ATC TAA TCA GGA G
G (以下「ペア8+」という)

アミノ基-CCT CCT GAT TAG ATT CCG T
T (以下「ペア8-」という)

20 アミノ基-CCG ACT ACA GAA GAG GAG A
A (以下「ペア7+」という)

実施例2

HCV抗体、TP検出用オリゴヌクレオチド標識IgGの調製

ウサギIgGにペア8-を導入した。すなわち、ウサギIgG
25 mgを含む0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液2mlと、Ig
25 Gの50~100倍モル過剰のSAT A (ピアス社製)を37℃で
1時間反応させた。反応後、終濃度0.1M Tris塩酸緩衝液
、0.1Mヒドロキシルアミンになるようにそれぞれの試薬を添加

して、37℃で1時間反応させ、その後 Sephadex G-25
(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を充填したカラム
にアプライし、SH導入ウサギ IgGを調製した。一方、ペア8-
1000 nmolを溶解した、5 mM EDTAを含む0.1 M MO
5 PS緩衝液 pH 7.0に、オリゴヌクレオチドの50倍モル過剰の
EMCS (同仁化学社製)を添加し、37℃で1時間反応させた。
反応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基
導入オリゴヌクレオチドを調製した。このマレイミド基導入オリゴ
ヌクレオチドを、SH基導入 IgGと37℃で1時間反応させ、次
10 いで Ultrogel AcA 34 (Biosepra社製)にア
プライし、ペア8-標識ウサギ IgGを調製した。

実施例 3

金コロイド標識ストレプトアビジンの調製

粒径 40 nm の金コロイド (530 nm における吸光度) 5 ml
15 と 150 µg ストレプトアビジン (ベクター社製) を含む 2 mM ホ
ウ酸緩衝液 pH 9.0 1 ml を混合して反応させた。この後、牛
血清アルブミンを終濃度 1% になるように添加してブロッキングを
行い、遠心分離により金コロイド標識ストレプトアビジンを沈さ
として回収し、牛血清アルブミン 1% 溶液で遠心洗浄を行い、同溶液
20 で沈さを懸濁して、金コロイド標識ストレプトアビジンを調製した
。

実施例 4

オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンの調製

ストレプトアビジン 2 mg を溶解した 0.2 M ホウ酸緩衝液 pH
25 8.0 1 ml に、ストレプトアビジンの 100 倍モル過剰の SA
TA を添加して、37℃で1時間反応させた。その後、終濃度 0.
1 M Tris、及び 0.1 M ヒドロキシルアミンとなるように試薬

を添加して、37℃で30分反応させた。この後、Sephadex G-25にアプライし、SH基導入ストレプトアビジンを得た。一方、ペア8 + 216 nmolを溶解した、5 mM EDTAを含む0.1 M MOPS緩衝液pH 7.0に、オリゴヌクレオチドの1000倍モル過剰のEMCSを添加し、37℃で1時間反応させた。反応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基導入オリゴヌクレオチドを導入した。このマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを、SH基ストレプトアビジンと37℃で1時間反応させ、次いでUltragel AcA 34にアプライし、ペア8 + 標識ストレプトアビジンを調製した。

実施例 5

HCV core 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジンの調製

前記実施例 3 で調製した金コロイド標識ストレプトアビジン 200 μ l とビオチン導入 HCV core 3 ペプチド（イノジェネティクス社製） 5 μ l を混合して 37℃ で 1 時間反応させた後、金コロイド複合体を遠心分離により沈さとして回収し、牛血清アルブミン 1% 溶液で遠心洗浄を行い、同溶液で沈さを懸濁して、HCV core 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジンを調製した。

実施例 6

HCV core 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンの調製

前記実施例 4 で調製したオリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジン 200 μ g に前記実施例 5 で使用したビオチン導入 HCV core 3 ペプチド 56 μ g を混合して 37℃ で 1 時間反応させ、YM 30（ミリポア社製）を用いた限外濾過を行い、HCV cor

e 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンを調製した。

実施例 7

ペア 8 - 標識 I g G 結合ニトロセルロース膜の調製

- 5 前記実施例 2 で調製したペア 8 - 標識ウサギ I g G を 1 m g / m l となるように希釈して X Y 3 0 0 0 (商品名、バイオドット社製、テストストリップ製造用 X Y 分注システム) に充填し、P E T で裏打ちをしたニトロセルロース膜 (m d i 社製) に塗布した。乾燥後、ブロックエース (商品名、雪印乳業社製、ブロッキング剤) で
- 10 室温、3 時間ブロッキングを行い、精製水で洗浄後、乾燥させた。この後、一端にセルロース製濾紙 (ワットマン社製 W F 1 . 5 あるいは m d i 社製) を貼り付け、もう一端にはコンジュゲートリリスパッド (m d i 社製、ガラスフィルター) を貼り付けた (一部は 2 重になるようにした)。これを幅 5 m m になるように切断し、ハ
- 15 ウジングに格納した。

実施例 8

H C V 抗体陽性血清での反応性

- 前記実施例 5 で調製した H C V c o r e 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジン 5 u l と前記実施例 6 で調製した H C
- 20 V c o r e 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジン 1 5 0 n g 、 4 . 4 % T w e e n 8 0 、 4 4 m M E D T A を含む溶液 1 1 . 5 u l に、H C V 抗体陽性血清を 1 0 0 u l 添加し、混合して素早く、前記実施例 7 で調製したペア 8 - 標識 I g G 結合ニトロセルロース膜の試料添加窓に添加した。1 5 分後ペア 8 -
- 25 標識 I g G を塗布した部位に金コロイドの赤紫色のラインが観察された。一方、対照として H C V 抗体が含まれていないことがわかっている血清を添加した場合は、ラインが観察されなかった。以上の

結果より、リガンドに対する特異的な抗体が含まれることが本発明の方法により判定できることが確認できた。

実施例 9

金コロイド標識 TP 抗原の調製

- 5 40 nm の粒径の金コロイド 5 ml と 100 μ g の遺伝子組み換え操作により得られた TP 17 K 抗原 (Lee Labs 社製) を含む 2 mM ホウ酸緩衝液 pH 9.0 1 ml を混合して反応させた。この後、牛血清アルブミンを終濃度 1% になるように添加してブロッキングを行い、遠心分離により金コロイド標識 TP 抗原を沈さ
10 として回収し、牛血清アルブミン 1% 溶液で遠心洗浄を行い、同溶液で沈さを懸濁して、金コロイド標識 TP 抗原を調製した。

実施例 10

オリゴヌクレオチド標識アビジンの調製

- アビジン 10 mg を溶解した 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0
15 1 ml に、アビジンの 100 倍モル過剰の EMCS を添加して、37℃ で 1 時間反応させた。この後、Sephadex G-25 にアプライし、マレイミド基導入アビジンを得た。一方、ペア 8 + 375 nmol を溶解した、5 mM EDTA を含む 0.1 M MOPS 緩衝液 pH 7.0 に、オリゴヌクレオチドの 100 倍モル過剰の SA
20 TA を添加し、37℃ で 1 時間反応させた。反応後、終濃度 0.1 M Tris、及び 0.1 M ヒドロキシルアミンとなるように試薬を添加して、37℃ で 30 分反応させた。次いで常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、SH 基導入オリゴヌクレオチドを調製した。この SH 基導入オリゴヌクレオチドを、マレイミド基アビジンと
25 37℃ で 1 時間反応させ、次いで Ultrogel AcA 44 にアプライし、ペア 8 + 標識アビジンを調製した。

実施例 11

ビオチン標識TP17K抗原の調製

500 μ gのTP17K抗原（イノジェネティクス社製）と5 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.0 0.5 mlに、TP17K抗原の100倍モル過剰のNH₂-biotin（ピ
5 アス社製）を添加して37℃で1時間反応させ、反応後Sephadex G-25カラムにアプライして、ビオチン標識TP17K抗原を調製した。TP17K抗原の回収率は、75%であった。

実施例12

10 ビオチン化TP17K抗原とオリゴヌクレオチド標識アビジンの反応によるオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原の調製

前記実施例10で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと前記実施例11で調製したビオチン標識TP17K抗原をモル比で、それぞれ1:8、1:4、1:2、1:1、1:0.5という混合
比で37℃で30分間反応させ、4℃に保存した。

15 前記実施例10で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと前記実施例11で調製したビオチン標識TP17K抗原を混合しているだけであるので、TP17K抗原の回収率は、75%であった。

実施例13

20 種々の混合比時のオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原の反応性

前記実施例12で調製した、種々の混合比時のオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原の反応性を評価した。すなわち、前記実施例9で調製した金コロイド標識TP抗原を5 μ l、ビオチン1 mg/mlを5 μ l、TP抗体陰性血清90 μ lに、前記実施例12で調
25 製したオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原をそれぞれ2 μ l添加した。この反応系を2本調製し、ここにTP抗体陽性血清を一方には添加し、もう一方には添加せずに、それぞれ速やかに混合し、

前記実施例 7 で調製したペア 8 - 標識 I g G 結合ニトロセルロース膜を格納したハウジングの試料添加窓に全量をそれぞれアプラインした。

5 アプライン後 20 分後の、陽性検体でのラインの濃さは、1 : 2 のものが最も濃く、次いで 1 : 4 と 1 : 1 がほぼ同等、これに次いで、1 : 0.5、1 : 8 という順であった。一方 TP 抗体陰性血清を添加したものはいずれの混合比であってもラインは出現しなかった。

10 この成績は、オリゴヌクレオチド標識アビジンとビオチン標識抗原の混合比を変化させることによって、容易に検出感度を変化させることが可能であることを示している。

実施例 14

HBs 抗原検出用のオリゴヌクレオチド標識 I g G の調製

15 ウサギ I g G にペア 1 - を導入した。方法は、前記実施例 2 と同様にした。

実施例 15

20 HBs 抗原検出用のオリゴヌクレオチド標識マウス抗 HBs - F a b ' の調製 モノクローン抗 HBs - I g G 10 m g を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 p H 3.5 に、I g G の 5 % になるようにペプシン（ペーリンガーマンハイム社製）を添加して 37 °C で一定時間反応させた。反応後、0.1 M リン酸緩衝液 p H 6.0 で平衡化した U l t r o g e l A c A 4 4 （商品名、バイオセブラ社製）カラムにアプラインし、F (a b ')₂ 画分を収集した。

25 この F (a b ')₂ 5.2 m g を Y M 3 0 （ミリポア社製）による限外濾過で濃縮後、終濃度 0.1 M になるようにメルカプトエチルアミン（ナカライテスク社製）を添加して、37 °C で 90 分間還元した。この後、S e p h a d e x G - 2 5 カラム（商品名、ア

マシャムファルマシアバイオテク社製) にアブライしてマウス抗H B s - F a b ' 2 . 6 m g を得た。

一方ペア1 + 1 9 1 n m o l を溶解した5 m M E D T A を含む
0 . 1 M M O P S 緩衝液p H 7 . 0 に、オリゴヌクレオチドの1 0
5 0 倍モル過剰のE M C S を添加し、3 7 ° C で3 0 分反応させた。反
応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基導
入オリゴヌクレオチドを調製した。

このマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを、マウス抗H B s -
F a b ' と3 7 ° C で1 時間反応させ、次いでU l t r o g e l A
10 c A 4 4 にアブライし、ペア1 + 標識マウス抗H B s - F a b ' を
調製した。

実施例 1 6

H B s 抗原 - T P 抗体を同時に検出するためのニトロセルロース
膜の調製

15 前記実施例 2 で調製したペア 8 - 標識ウサギ I g G と前記実施例
1 4 で調製したペア 1 - 標識ウサギ I g G を 1 m g / m l となるよ
うに希釈して、それぞれ X Y 3 0 0 0 (商品名、バイオドット社製
) に充填し、P E T で裏打ちをしたニトロセルロース膜に、ペア 1
- は原点より 3 0 m m の位置に、ペア 8 - は原点より 3 5 m m の位
20 置にそれぞれ塗布した。乾燥後、ブロックエース (商品名、雪印乳
業社製) で室温、3 時間ブロッキングを行い、精製水で洗浄後、乾
燥させた。この後、一端にセルロース製濾紙 (ワットマン社製 W F
1 . 5 あるいは m d i 社製) を貼り付け、もう一端にはコンジュゲ
ートリリースパッド (アドバンスド マイクロデバイス社製) を貼
25 り付けた (一部は 2 重になるようにした) 。これを幅 5 m m になる
ように切断し、ハウジングに格納した。

実施例 1 7

H B s 抗原 - T P 抗体を同時に独立して検出できるかどうかの検討

H B s 抗原 - T P 抗体を同時に独立して検出できるかどうかの検討を次のようにして行った。すなわち、前記実施例 9 で調製した金コロイド標識 T P 抗原を 5 u l、ビオチン 1 m g / m l を 5 u l、T P 抗体及び H B s 抗原陰性血清 9 0 u l に、前記実施例 1 2 で調製した 1 : 4 の混合比で調製したオリゴヌクレオチド標識 T P 1 7 K 抗原を 1 0 倍希釈しその溶液を 1 u l 添加した。これに前記実施例 1 5 で調製したオリゴヌクレオチド標識マウス抗 H B s - F a b
10 ' を 9 0 n g 添加し、金コロイド標識抗 H B s 抗体（ブリティッシュバイオセル インターナショナル社製）を 9 u l 添加した。この反応系を 4 本調製し、ここに T P 抗体陽性血清 5 u l を一方には添加し、1 本には T P 抗体陰性、H B s 抗原陰性血清を 5 u l 添加し、さらに、H B s 抗原 5 0 n g / m l 及び 2 2 0 u g / m l をそれぞれ含む血清をそれぞれ 5 u l 速やかに混合し、前記実施例 1 6 で調製したペア 8 - 標識ウサギ I g G 結合及びペア 1 - 標識ウサギ I g G 結合ニトロセルロース膜を格納したハウジングの試料添加窓に全量をそれぞれアプライした。

アプライ後 2 0 分の判定で、T P 抗体陰性、H B s 抗原陰性血清を添加したものは、両方のラインは出現せず、T P 抗体陽性血清を添加したものはペア 8 - が塗布された部分のみに、また、H B s 抗原を添加したものはペア 1 - が塗布された部分のみにラインが出現し、それぞれの項目が同じニトロセルロース膜上で独立して検出できた。

25 実施例 1 8

ビオチン標識 T P 1 7 K 抗原の調製

5 0 0 u g の T P 1 7 K 抗原（L e e L a b s 社製）と 5 m M

EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.0 0.5mlに、TP17K抗原の100倍モル過剰のNH₂-biotinを添加して37℃で1時間反応させ、反応後Sephadex G-25カラムにアプライして、ビオチン標識TP17K抗原を調製した。TP17K抗原の回収率は、75%であった。このビオチン標識TP17K抗原は、前記実施例12に記載したように、前記実施例10で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと混合するだけであるので、最終的な回収率は75%であった。

比較例

TP17K抗原の直接標識によるオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原の調製

TP17K抗原（Lee Labs社製）473μgと5mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.4に、TP17K抗原の20倍モル過剰のSATAを添加し、37℃で90分反応させ、この後ヒドロキシルアミン、トリス緩衝液を添加して反応させた。次いでSephadex G-25カラム（商品名、アマシウムファルマシアバイオテク社製）にアプライし、SH基導入TP17K抗原200μg（回収率42.2%）を得た。一方、ペア7+ 133nmol、5mMEDTAを含む0.1M MOPS緩衝液pH7.85に、ペア7+の200倍モル過剰のEMCSを添加して、37℃で2時間反応させた。この後、常法によりオリゴヌクレオチドをエタノール沈殿、洗浄し、マレイミド基導入オリゴヌクレオチド105nmolを得た。

SH基導入TP17K抗原200μgとマレイミド基導入オリゴヌクレオチド105nmolを混合し、37℃で2時間反応させた。この後、Ultragel ACA44カラムにアプライし、オリゴヌクレオチド標識TP17K抗原150μg（回収率32%）

を得た。

前記実施例 18 と比較例を比較すると、比較例は、回収率が 32 %であるのに対して、実施例 18の方が回収率は 75 %と大幅に改善されることがわかった。

5 実施例 19

HCV core 2、core 3、core 6、core 10の
結合金コロイド標識ストレプトアビジンの調製

530 nmにおける吸光度が 1.0 を示すように調製した金コロイ
ド標識ストレプトアビジン（ブリティッシュバイオセルインターナ
10 ショナル社製）500 μ l とビオチン化 HCV core 2 2 μ
g、ビオチン化 HCV core 3 2 μ g、ビオチン化 HCV
core 6 2 μ g、ビオチン化 HCV core 10 2 μ g（
何れもイノジェネディクス社製）を混合して、37℃ 1時間反応さ
15 せた。反応後、遠心分離により、HCV core 2、core 3
、core 6、core 10 結合金コロイド標識ストレプトアビジ
ンを沈さとして回収した。この沈さを、2%のウシ血清アルブミン
を含む 20 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0 で懸濁して、4
℃で保存した。

実施例 20

20 オリゴヌクレオチド標識 HCV core 2、core 3、co
re 6、core 10 結合ストレプトアビジンの調製

前記実施例 4 で調製した、ペア 8 + 標識ストレプトアビジン 10
0 μ g に HCV core 2、core 3、core 6、及び co
re 10 30 μ g をそれぞれ別々に混合し、37℃ 1時間反応さ
25 せ、限外濾過により、ペア 8 + 標識 HCV core 2 結合スト
レプトアビジン、ペア 8 + 標識 HCV core 3 結合ストレプトア
ビジン、ペア 8 + 標識 HCV core 6 結合ストレプトアビジン

、ペア 8 + 標識 H C V c o r e 1 0 結合ストレプトアビジンをそれぞれ調製した。

実施例 2 1

オリゴヌクレオチド標識 H C V c o r e 2 + c o r e 3 + c o
5 r e 6 + c o r e 1 0 結合ストレプトアビジンの調製

前記実施例 4 で調製した、ペア 8 + 標識ストレプトアビジン 1 0
0 μ g に H C V c o r e 2、c o r e 3、c o r e 6、又は c o
r e 1 0 3 0 μ g を同時に混合し、3 7 $^{\circ}$ C 1 時間反応させ、限外
10 濾過により、ペア 8 + 標識 H C V c o r e 2 + c o r e 3 + c o
r e 6 + c o r e 1 0 結合ストレプトアビジンを調製した。

実施例 2 2

H C V 抗体陽性血清との反応性

前記実施例 8 と同様に、前記実施例 1 9 で調製した H C V c o
r e 2、c o r e 3、c o r e 6、c o r e 1 0 結合金コロイド標
15 識ストレプトアビジンと、前記実施例 2 0 で調製したペア 8 + 標識
H C V c o r e 2 結合ストレプトアビジン 3 7 . 5 n g、ペア
8 + 標識 H C V c o r e 3 結合ストレプトアビジン 3 7 . 5 n
g、ペア 8 + 標識 H C V c o r e 6 結合ストレプトアビジン 3
7 . 5 n g、ペア 8 + 標識 H C V c o r e 1 0 結合ストレプトア
20 ビジン 3 7 . 5 n g を含む組み合わせ（組み合わせ A）と、前記
実施例 1 9 で調製した H C V c o r e 2、c o r e 3、c o r e
6、c o r e 1 0 結合金コロイド標識ストレプトアビジン 5 μ l
と、前記実施例 2 1 で調製したオリゴヌクレオチド標識 H C V c
o r e 2 + c o r e 3 + c o r e 6 + c o r e 1 0 結合ストレプト
25 アビジン 1 5 0 n g を含む組み合わせ（組み合わせ B）を比較し
たところ、組み合わせ A では、H C V 抗体陽性血清との反応性が 5
分から、組み合わせ B では反応性が 7 分から確認できた。また、前

- 前記実施例 8 で行った実験では反応性が 15 分から確認できた。このことから、単一種のペプチドを標識ストレプトアビジンに結合させて反応系を構築するよりも、複数種のペプチドを標識ストレプトアビジンに結合させて反応系を構築した場合の方が反応性が高いことが分かった。

産業上の利用可能性

- 本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、試薬の感度をコントロールすることができる。
- 例えば、本発明のキットは、受容体 I 及び受容体 II 当たりのリガンド L 1 又はリガンド L 2 の量を調整することができる。このことにより、測定感度の調整が可能となる。具体的には、物質 R 1 は、物質 B 1 との結合ポイントを複数個有するものが使用でき、物質 B 1 を介して物質 R 1 にリガンド L 1 を複数個結合させることができる。また、物質 R 2 は、物質 B 2 との結合ポイントを複数個有するものを使用することができ、物質 B 2 を介して物質 R 2 にリガンド L 2 又はリガンド L 3 を複数個結合させることができる。

- 具体的には、物質 R 1 又は R 2 としてアビジン又はストレプトアビジンを使用する場合には、アビジン又はストレプトアビジンは物質 B 1 としてのビオチンとの結合部位を 1 分子あたり 4 個保有しているため、リガンド L の導入比を、アビジン又はストレプトアビジン当たり 1 から 4 個の間で変化させることが可能である。したがって、この導入率を制御することにより反応性、感度をコントロールすることも可能となる。さらに、この感度のコントロールは、化合物 L - B 1 - R 1 - M と化合物 L - B 1 - R 2 - B 3 の双方に行えるので、きめ細かい感度のコントロールが可能となる。

結合子 B 3 及び被結合子 R 3 として、種々の結合性の異なる組み

合わせの物質を選択することにより、結合性の強弱を変化させることができ、即ち、試薬の感度をコントロールすることができる。

結合子 B 3 と被結合子 R 3 として、少なくとも一部が相補的な配列をもつ RNA、DNA のオリゴヌクレオチドを使用する場合には、オリゴヌクレオチドの長短を変化させることにより、結合性の強弱をコントロールすることができる。

本発明のキットにおいては、物質 R 1 又は R 2 に結合させる複数のリガンドの各々の反応性を単一とするだけでなく、複数種としてもよい。この場合、リガンドの反応性が単一の場合よりも被測定物質 A に対する反応性が高まる。

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相化させるための結合子 B 3 及び被結合子 R 3 に RNA 又は DNA 等のオリゴヌクレオチドを用い、少なくとも一部の相補的結合により複合体を固相に結合させる場合には、オリゴヌクレオチドの配列を変化させた複数種のものが使用できるので、それぞれの種類に対応させた複数の分析対象物を同時に測定することが可能になる。

20

25

請 求 の 範 囲

1. 2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、
5 並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット：

1) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカーMを結合させてなる化合物R1-Mと、被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1を結合させてなる化合物L1-B1を結合させてなる化合物L1-B1-R1-Mで表される受容体I；
10

2) 被測定物質Aと結合性を有するリガンドL2に被測定物質Aとは異なる結合性を有する物質B2を導入してなる化合物L2-B2と、物質B2に対して結合性を有する物質R2に該物質B2とは異なる結合性を有する結合子B3を結合させてなる化合物R2-B3を予め結合させて得られた化合物L2-B2-R2-B3で表される受容体II；及び、
15

3) 結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される固相複合体。

2. タンパク質Pの一部を構成するリガンドL3に対して2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット：
20

1) タンパク質PにマーカーMを結合させた化合物P-Mで表される受容体I；
25

2) タンパク質PあるいはリガンドL3に被測定物質Aとは異なる

る結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 P - B 2 あるいは L 3 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を結合させて得られた化合物 P - B 2 - R 2 - B 3 あるいは L 3 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体。

3 . 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I 、下記の受容体 II 、並びに受容体 I 、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット :

1) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I ;

2) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 3 で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体。

4 . 前記物質 R 1 は、前記物質 B 1 との結合ポイントを複数個有し、物質 B 1 を介して物質 R 1 に前記リガンド L 1 が複数個結合されていることを特徴とする請求項 1 又は 3 記載のキット。

5 . 前記複数個のリガンド L 1 の各々の反応性は複数種である請

求項 4 記載のキット。

6. 前記物質 R 2 は、前記物質 B 2 との結合ポイントを複数個有し、物質 B 2 を介して物質 R 2 に前記リガンド L 2 又はリガンド L 3 が複数個結合されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のキット。

7. 前記複数個のリガンド L 2 又はリガンド L 3 の各々の反応性は複数種である請求項 6 記載のキット。

10

8. 前記固相複合体が、少なくとも前記受容体 II とは独立して存在している請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

9. 前記 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A が、DNA、RNA、抗原及び抗体の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

10. 前記リガンド L 1、リガンド L 2 又はリガンド L 3 が、DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

11. 前記リガンド L 1 及びリガンド L 2 が同一の物質である請求項 1 又は 3 記載のキット。

12. 前記リガンド L 1、L 2 及びリガンド L 3 が異なる配列を持つ物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

13. 前記物質 B 1 と物質 R 1、あるいは物質 B 2 と物質 R 2 の結合性は、解離定数として 10^{-8} から 10^{-16} (M) で示されるものである請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

5 14. 前記物質 B 1 及び／又は物質 B 2 がビオチンである請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

10 15. 前記物質 B 1 及び／又は物質 B 2 が DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

15 16. 前記物質 R 1 及び／又は物質 R 2 がストレプトアビジン及びアビジンの群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

17. 前記物質 R 1 及び／又は物質 R 2 が抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

20 18. 前記物質 R 1 及び物質 R 2 が同一物質である請求項 1 記載のキット。

19. 前記物質 R 1 及び物質 R 2 が異なる物質である請求項 1 記載のキット。

25 20. 前記結合子 B 3 と被結合子 R 3 は、DNA 又は RNA の少なくとも一部分の相補的結合により結合可能なものである請求項

1、2又は3記載のキット。

21. 前記マーカ－Mが着色色素、蛍光色素、発光性物質、金属コロイド、ラテックス、リポソーム、放射性同位元素、酵素、DNA及びRNAの群から選ばれた物質である請求項1、2又は3記載のキット。

22. 前記固相がポリスチレン、ニトロセルロース、ナイロン、セルロース及びガラスの群から選ばれた物質である請求項1、2又は3記載のキット。

23. 2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質Aを、

2) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカ－Mを結合させてなる化合物R1-Mと、上記被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1を結合させてなる化合物L1-B1を結合させてなる化合物L1-B1-R1-Mで表される受容体I、並びに、

3) 被測定物質Aと結合性を有するリガンドL2に被測定物質Aとは異なる結合性を有する物質B2を導入してなる化合物L2-B2と、物質B2に対して結合性を有する物質R2に該物質B2とは異なる結合性を有する結合子B3を結合させてなる化合物R2-B3を予め結合させて得られた化合物L2-B2-R2-B3で表される受容体IIと接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される

固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカーMを検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法。

5 24. タンパク質Pの一部を構成するリガンドL3に対して2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質Aを、

10 2) タンパク質PにマーカーMを結合させた化合物P-Mで表される受容体I、並びに

15 3) タンパク質PあるいはリガンドL3に被測定物質Aとは異なる結合性を有する物質B2を導入してなる化合物P-B2あるいはL3-B2と、物質B2に対して結合性を有する物質R2に該物質B2とは異なる結合性を有する結合子B3を結合させてなる化合物R2-B3を結合させて得られた化合物P-B2-R2-B3あるいはL3-B2-R2-B3で表される受容体IIと接触させて反応させて複合体を生成し、

20 4) 前記生成した複合体を、結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカーMを検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法。

25 25. 2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質Aを、

2) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカーMを結

合させてなる化合物 $R_1 - M$ と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L_1 と物質 B_1 を結合させてなる化合物 $L_1 - B_1$ を結合させてなる化合物 $L_1 - B_1 - R_1 - M$ で表される受容体 I、並びに、

- 5 3) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L_2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B_3 を予め結合させて得られた化合物 $L_2 - B_3$ で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

- 10 4) 前記生成した複合体を、結合子 B_3 に対して結合性を有する被結合子 R_3 を固相に結合させてなる化合物 $R_3 - \text{固相}$ で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法。

15

20

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1

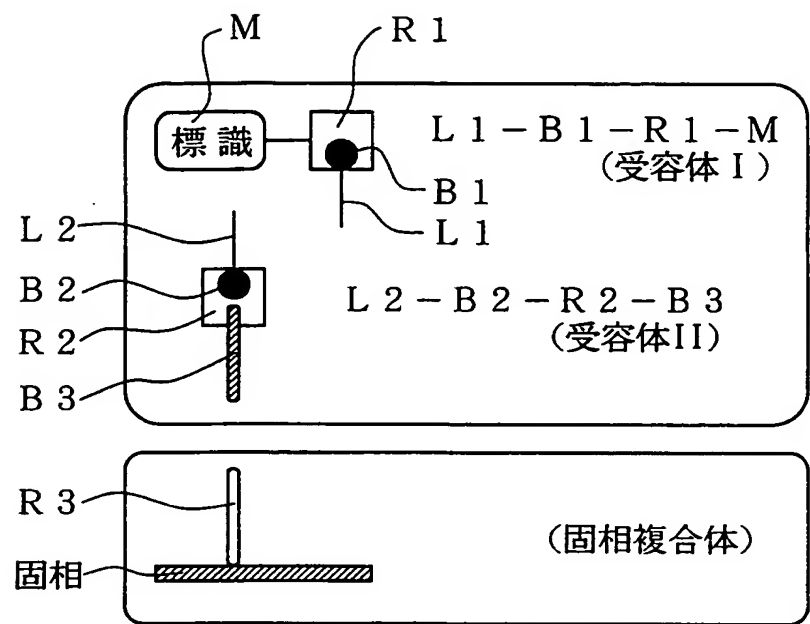
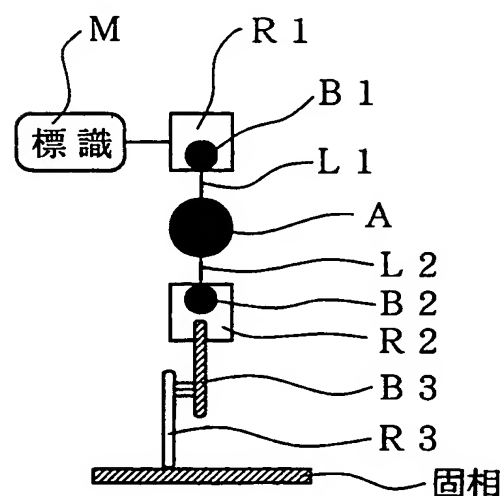


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3

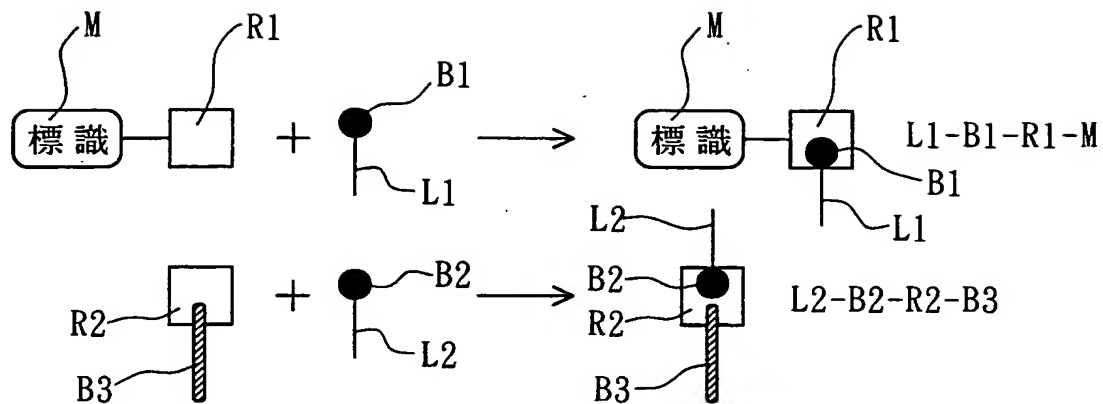
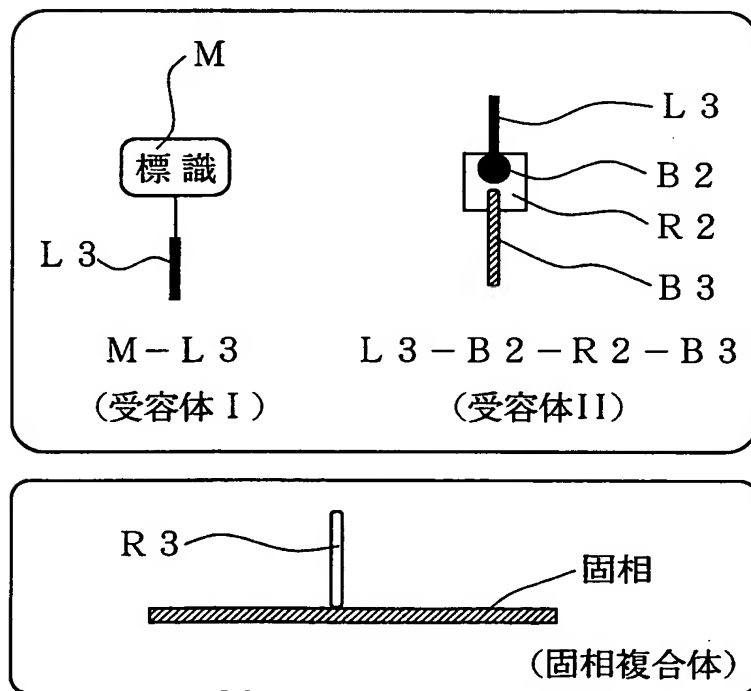


図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図5

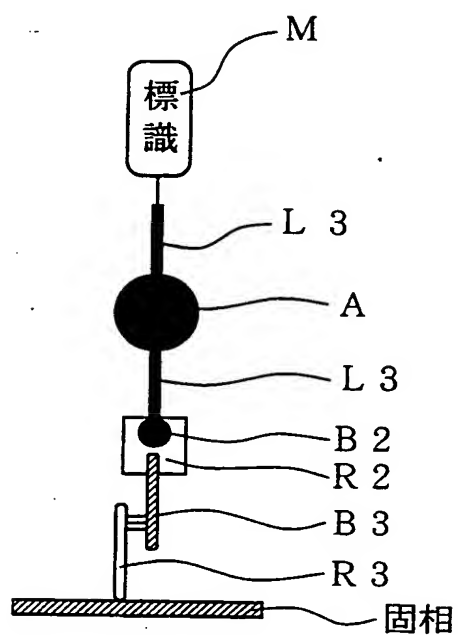
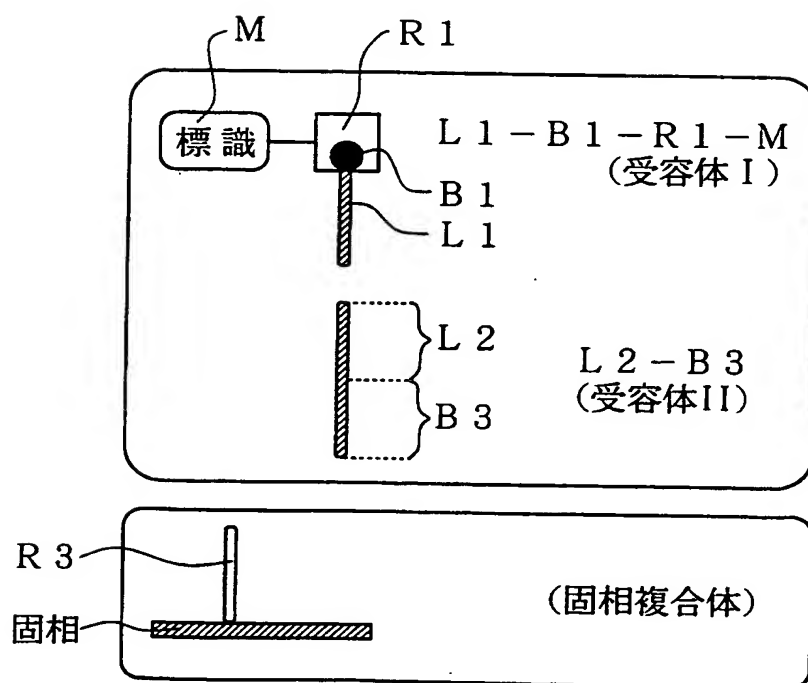


図6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 7

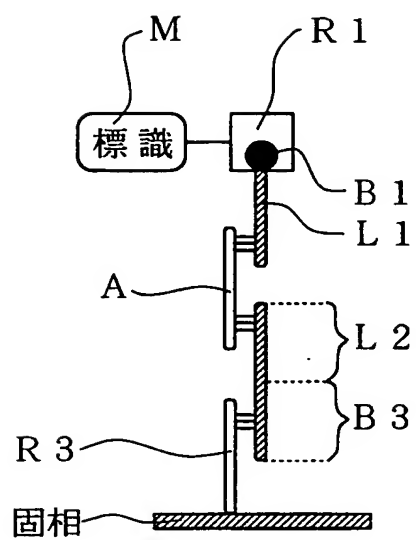
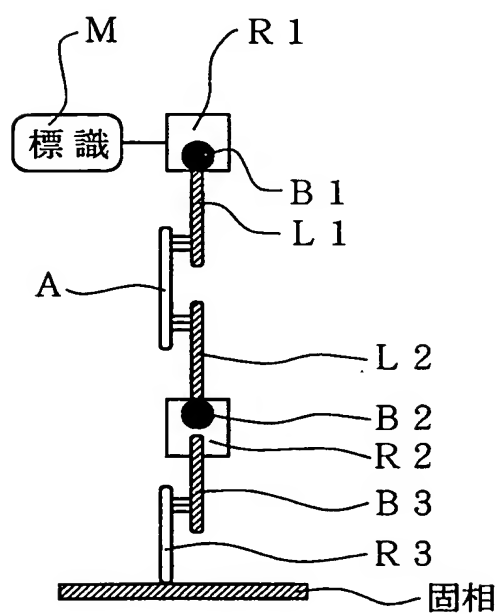


図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Kit for detection or measurement of material to be measured and
method for detection or measurement

<130> NSM003726PCT

<160> 5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 1

gaattcccgg ggatccgtcg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 2

cgacggatcc ccggaattc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 3

aacggaatct aatcaggagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 4

cctcctgatt agattccgtt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 5

ccgactacag aagaggagaa 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-304397, A (Sumitomo Pharmaceuticals Company Limited), 22 November, 1996 (22.11.96), Figs. 1 to 3; Claims (Family: none)	1-25
Y	JP, 8-29422, A (AISIN SEIKI CO., LTD.), 02 February, 1996 (02.02.96), Fig. 1; Claims (Family: none)	1-25
Y	JP, 5-506095, A (Hygia Sciences Inc.), 02 September, 1993 (02.09.93), Claims & WO, 91/12528, A	1-25
Y	JP, 10-253632, A (Nitsusui Seiyaku K.K.), 25 September, 1998 (25.09.98), Figs. 1 to 9 & WO, 98/40740, A & EP, 905517, A	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2000 (09.11.00)Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-304397, A (住友製薬株式会社) 22.11月.1996 (22.11.96) 第1-3図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 8-29422, A (アイシン精機株式会社) 2.2月.1996 (02.02.96) 第1図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 5-506095, A (ハイジアーサイエンス、インコーポレイテッド) 2.9月.1993 (02.09.93) 特許請求の範囲 & WO, 91/12528, A	1-25
Y	JP, 10-253632, A (日水製薬株式会社) 25.9月.1998 (25.09.98) 第1-9図 & WO, 98/40740, A & EP, 905517, A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.11.00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REC'D 07 DEC 2001

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 NSM3726PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06187	国際出願日 (日.月.年) 11.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/543		
出願人(氏名又は名称) 日水製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.03.01	国際予備審査報告を作成した日 22.11.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 亀田宏之 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9015

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
_____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
_____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
_____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
_____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-25

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-25

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-25

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-25

請求の範囲1-25は、国際調査報告で引用した

文献1(JP 8-304397 A(住友製薬株式会社)22.11月.1996(22.11.96))

文献2(JP 8-29422 A(アイシン精機株式会社)2.2月.1996(02.02.96))

文献3(JP 5-506095 A(ハイジューサイエンシイズ、インコーポレイテッド)2.9月.1993(02.09.93))

文献4(JP 10-253632 A(日水製薬株式会社)25.9月.1998(25.09.98))

から自明である。

国際調査報告で引用した文献1-4には、複数の特異的結合物質をコンポーネントとして用いた固相複合体含有キットおよび測定方法について記載されている。

文献1-4は固相複合体含有キットとして使用するコンポーネント数や使用形態が本願発明と相違する。

しかし、使用するコンポーネント数や使用形態は当業者が適宜選択しえたと認められる。

また、本願発明の感度をコントロールできる等の効果は文献1-4から予測できる範囲のものであり格別とは認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NSM3726PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06187	International filing date (day/month/year) 11 September 2000 (11.09.00)	Priority date (day/month/year) 13 September 1999 (13.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/543		
Applicant NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets; including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 March 2001 (01.03.01)	Date of completion of this report 22 November 2001 (22.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP00/06187

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/06187

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 to 25

Document 1: JP, 8-304397, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 22 November 1996 (22.11.96)

Document 2: JP, 8-29422, A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 2 February 1996 (02.02.96)

Document 3: JP, 5-506095, A (Hygeia Sciences, Inc.), 2 September 1993 (02.09.93)

Document 4: JP, 10-253632, A (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 September 1998 (25.09.98)

Claims 1 to 25 are obvious in the light of the above documents cited in the international search report.

Documents 1 to 4 cited in the international search report disclose a solid phase complex-containing kit that uses a plurality of unique binding substances as components, and an assaying method.

The inventions disclosed in Documents 1 to 4 differ from the invention of the present application in terms of the components used as a solid phase complex-containing kit and the method of use thereof.

However, the components used and the method of use thereof are features fittingly determined by a person skilled in the art.

Moreover, effects of the invention of the present application such as being able to control sensitivity fall

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/06187

within a range of effects predictable from Documents 1 to 4, and are not recognized as being particularly unusual.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 NSM3726PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06187	国際出願日 (日.月.年) 11.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/543		
出願人(氏名又は名称) 日水製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - II ☐ 優先権
 - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - IV ☐ 発明の単一性の欠如
 - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ☐ ある種の引用文献
 - VII ☐ 国際出願の不備
 - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.03.01	国際予備審査報告を作成した日 22.11.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 亀田宏之 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9015

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の種類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-25	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-25

請求の範囲1-25は、国際調査報告で引用した

文献1(JP 8-304397 A(住友製薬株式会社)22.11月.1996(22.11.96))

文献2(JP 8-29422 A(アイシン精機株式会社)2.2月.1996(02.02.96))

文献3(JP 5-506095 A(ハイジアーサイエンシイズ、インコーポレイテッド)2.9月.1993(02.09.93))

文献4(JP 10-253632 A(日水製薬株式会社)25.9月.1998(25.09.98))

から自明である。

国際調査報告で引用した文献1-4には、複数の特異的結合物資をコンポーネントとして用いた固相複合体含有キットおよび測定方法について記載されている。

文献1-4は固相複合体含有キットとして使用するコンポーネント数や使用形態が本願発明と相違する。

しかし、使用するコンポーネント数や使用形態は当業者が適宜選択しえたと認められる。

また、本願発明の感度をコントロールできる等の効果は文献1-4から予測できる範囲のものであり格別とは認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-304397, A (Sumitomo Pharmaceuricals Company Limited), 22 November, 1996 (22.11.96), Figs. 1 to 3; Claims (Family: none)	1-25
Y	JP, 8-29422, A (AISIN SEIKI CO., LTD.), 02 February, 1996 (02.02.96), Fig. 1; Claims (Family: none)	1-25
Y	JP, 5-506095, A (Hygia Sciences Inc.), 02 September, 1993 (02.09.93), Claims & WO, 91/12528, A	1-25
Y	JP, 10-253632, A (Nitsusui Seiyaku K.K.), 25 September, 1998 (25.09.98), Figs. 1 to 9 & WO, 98/40740, A & EP, 905517, A	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2000 (09.11.00)

Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-304397, A (住友製薬株式会社) 22. 11月. 1996 (22. 11. 96) 第1-3 図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 8-29422, A (アイシン精機株式会社) 2. 2月. 1996 (02. 02. 96) 第1図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 5-506095, A (ハイザー サイエンシズ、インコーポレイテッド) 2. 9月. 1993 (02. 09. 93) 特許請求の範囲 & WO, 91/12528, A	1-25
Y	JP, 10-253632, A (日水製薬株式会社) 25. 9月. 1998 (25. 09. 98) 第1-9図 & WO, 98/40740, A & EP, 905517, A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

287

PCT/JP00/06187

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
13 June 2001 (13.06.01)

International application No.
PCT/JP00/06187

Applicant's or agent's file reference
NSM3726PCT

International filing date (day/month/year)
11 September 2000 (11.09.00)

Priority date (day/month/year)
13 September 1999 (13.09.99)

Applicant

OKU, Yuichi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
01 March 2001 (01.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Henrik Nyberg

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 NSM3726PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06187	国際出願日 (日.月.年) 11.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
出願人(氏名又は名称) 日水製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-304397, A (住友製薬株式会社) 22. 11月. 1996 (22. 11. 96) 第1-3図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 8-29422, A (アイシン精機株式会社) 2. 2月. 1996 (02. 02. 96) 第1図、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 5-506095, A (ハイザー サイエンシズ、インコーポレイテッド) 2. 9月. 1993 (02. 09. 93) 特許請求の範囲 & WO, 91/12528, A	1-25
Y	JP, 10-253632, A (日水製薬株式会社) 25. 9月. 1998 (25. 09. 98) 第1-9図 & WO, 98/40740, A & EP, 905517, A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

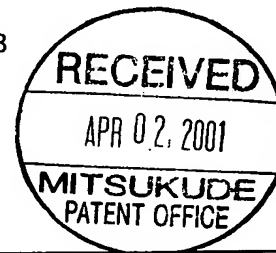
PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MITSUKUDE, Yoshihiko
T-Kanai Building, 2-1, Kanda-awaji-
cho
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0063
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2001 (22.03.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference NSM3726PCT			
International application No. PCT/JP00/06187	International filing date (day/month/year) 11 September 2000 (11.09.00)	Priority date (day/month/year) 13 September 1999 (13.09.99)	
Applicant NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA, EP, JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
22 March 2001 (22.03.01) under No. WO 01/20328

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)